

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

KHÔNG THỊ DIỆP

**XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM VI SINH CỦA
ESCHERICHIA COLI SINH BETA LACTAMASE
PHỔ MỞ RỘNG Ở NGƯỜI KHỎE MẠNH
TẠI CỘNG ĐỒNG, HUYỆN VŨ THỦ,
TỈNH THÁI BÌNH, NĂM 2016**

Chuyên ngành: Vi sinh y học

Mã số: 62 72 01 15

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hà Nội – 2020

**CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU NÀY ĐƯỢC HOÀN THÀNH
TẠI VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Hoàng Thị Thu Hà
2. PGS.TS. Phạm Ngọc Khải

Phản biện1:

.....

Phản biện2:

.....

Phản biện3:

.....

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện
học tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Vào hồi ...giờ ..., ngày ...tháng ...năm 2020

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia.
- Thư viện Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Khổng Thị Điệp, Phạm Ngọc Khái, Đỗ Thị Bích Ngọc, Hoàng Thị Thu Hà, (2019), “Đặc điểm nhóm phát sinh loài của các chủng *Escherichia coli* sinh ESBL phân lập từ mẫu phân người khỏe mạnh ở cộng đồng thuộc huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016” , Tạp chí Y học Dự phòng, tập 29 (3):42-47.
2. Khổng Thị Điệp, Phạm Ngọc Khái, Trần Huy Hoàng, Phạm Duy Thái, Hoàng Thị Thu Hà, (2019), “Đánh giá khả năng truyền plasmid mang các gen mã hóa ESBL từ các chủng *Escherichia coli* sinh ESBL phân lập từ mẫu phân người khỏe mạnh sang *Escherichia coli* J53 bằng hình thức tiếp hợp in vitro”, Tạp chí Y học Dự phòng, Tập 29 (12): 77-83.
3. Khổng Thị Điệp, Phạm Ngọc Khái, Hoàng Thị Thu Hà, (2019), “Thực trạng *Escherichia coli* sinh beta-lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016”, Tạp chí Y học Dự phòng Tập 29 (12): 111-117.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, tình trạng vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh ngày càng gia tăng và sự lan truyền các vi khuẩn kháng kháng sinh đang trở thành mối đe dọa lớn cho sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới.

Có nhiều cơ chế kháng kháng sinh, trong đó cơ chế ức chế bằng enzyme β -lactamase phổ rộng (Extended-Spectrum Beta-Lactamases ESBL) là cơ chế thường gặp. ESBL thường được tìm thấy trong các nhóm *Enterobacteriaceae*, thường gặp ở *Escherichia coli* (*E. coli*). Các gen mã hóa sinh ESBL thường nằm trên plasmid của vi khuẩn nên có thể dễ dàng được truyền cho các vi khuẩn khác trong cùng loài hoặc khác loài làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh.

E. coli sinh ESBL được phát hiện ở khắp nơi trên thế giới, đặc biệt là ở Trung Quốc và các nước Đông Nam Á tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL cao (trên 50%) ở cả bệnh viện và cộng đồng.

Tại Việt Nam, các thông tin về đặc điểm vi sinh của *E. coli* sinh ESBL tại cộng đồng hầu như chưa được thông báo. Tìm hiểu các thông tin này sẽ góp phần đưa ra bức tranh tổng thể về dịch tễ học của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL tại cộng đồng, cung cấp cơ sở khoa học cho việc thiết lập hệ thống giám sát, phòng ngừa sự lây nhiễm và lan truyền vi khuẩn kháng kháng sinh tại cộng đồng. Vì vậy chúng tôi tiến hành đề tài: **“Xác định một số đặc điểm vi sinh của *Escherichia coli* sinh beta lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016”**

Mục tiêu nghiên cứu

1. Xác định sự lưu hành của *Escherichia coli* sinh β lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016.

2. Xác định một số đặc điểm sinh học của các chủng *Escherichia coli* sinh β -lactamase phổ mở rộng phân lập được từ người khỏe mạnh tại cộng đồng.

Những điểm mới về khoa học và giá trị thực tiễn của đề tài

1. Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ kháng đa thuốc của các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập từ cộng đồng rất cao (86,1%) góp phần cảnh báo về tình trạng kháng đa kháng thuốc của các chủng vi khuẩn tại cộng đồng. Do đó cần có các biện pháp can thiệp để làm giảm nguy cơ kháng kháng sinh trong cộng đồng.

2. Nghiên cứu phát hiện tỷ lệ mang gen *mcr-1* mã hóa khả năng kháng colistin ở các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập từ người khỏe mạnh tại Vũ Thư, Thái Bình là 8% (11/137).

3. Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam sử dụng kỹ thuật PFGE, Southern Blot và tiếp hợp để nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trên người khỏe mạnh tại cộng đồng ở khu vực nông thôn. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc sử dụng phối hợp các kỹ thuật có thể đánh giá được khả năng lan truyền của các chủng *E. coli* sinh ESBL tại cộng đồng.

CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án gồm 126 trang: Đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (34 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (33 trang), kết quả nghiên cứu (30 trang), bàn luận (24 trang), kết luận (2 trang), kiến nghị (1 trang), Trong luận án có 44 bảng, 11 biểu đồ, 13 hình. Luận án có 127 tài liệu tham khảo, trong đó có 23 tài liệu tiếng Việt, 104 tài liệu tiếng Anh.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tình hình nhiễm và kháng kháng sinh của *E. coli* sinh β -lactamase phổ mở rộng ở người

1.1.1. Tình hình nhiễm *E. coli* sinh ESBL ở người

Hiện nay, *E. coli* sinh ESBL ngày càng gia tăng ở nhiều nơi trên thế giới. Vi khuẩn này được phát hiện tại nhiều bệnh viện ở hầu hết các châu lục, đặc biệt là ở một số nước châu Á như Ấn Độ (79%), Trung Quốc (55%), Thái Lan (50,8%), Việt Nam (51,6%). Vi khuẩn này cũng đã được phát hiện ở người khỏe mạnh tại cộng đồng một số

nước như Thụy Sĩ (5,8%), Đức (6,3%), Trung Quốc (50,5%) và Thái Lan (61,7%).

1.1.2. Tình hình kháng kháng sinh của *E. coli* sinh ESBL ở người

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy tình trạng kháng kháng sinh của *E. coli* sinh ESBL ngày càng gia tăng và nghiêm trọng. Vi khuẩn này không chỉ kháng lại hầu hết các kháng sinh thông thường với tỷ lệ cao mà còn kháng cả colistin và carbapenem. Phần lớn các chủng *E. coli* sinh ESBL là các chủng đa kháng thuốc với khả năng kháng lại ít nhất 3 nhóm kháng sinh trở lên. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* sinh ESBL cao hơn rất nhiều so với vi khuẩn không sinh ESBL.

1.2. Một số đặc điểm và phương pháp nghiên cứu *E. coli* sinh ESBL

1.2.1. Đặc điểm sinh học

1.2.2. Đặc điểm và sự lưu hành các ESBL và các gen mã hóa sinh ESBL

ESBL là các men do vi khuẩn sinh ra, có tác dụng phá hủy nối amide của vòng β -lactam gây bất hoạt các thuốc kháng sinh nhóm β -lactam. Do đó vi khuẩn sinh men này có khả năng kháng các kháng sinh nhóm β -lactam rất hiệu quả.

ESBL thường được tìm thấy trong các vi khuẩn đường ruột, thường gặp ở *E. coli*. Có nhiều loại ESBL, trong đó ba loại là TEM, SHV và CTX-M được xem là các ESBL phổ biến và có tầm ảnh hưởng rộng lớn nhất. Các loại ESBL này vẫn không ngừng biến đổi, ngày càng tăng về số lượng và phức tạp hơn về đặc tính. Hiện nay đã phát hiện hơn 500 loại ESBL. Trong suốt những năm 1990, hầu hết các báo cáo về ESBL đều tập trung vào TEM, SHV-loại ESBL có liên quan đến lây nhiễm chéo trong bệnh viện. Tuy nhiên những báo cáo gần đây cho thấy chủ yếu xuất hiện các ESBL loại CTX-M.

1.2.3. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài

Vi khuẩn *E. coli* được chia thành 4 nhóm phát sinh loài gồm: A, B1, B2 và D, mỗi nhóm có đặc điểm về môi trường sinh thái, ký chủ,

khả năng gây bệnh và kháng kháng sinh khác nhau.

1.2.4. Đặc điểm gây bệnh ở vi khuẩn *E. coli* trên người

E. coli là căn nguyên gây bệnh tiêu chảy, viêm đường tiết niệu, nhiễm khuẩn huyết, viêm phổi ở trẻ sơ sinh. Trong đó tiêu chảy là hội chứng hay gặp nhất liên quan đến khả năng gây bệnh của *E. coli*. Khả năng gây bệnh của *E. coli* phụ thuộc vào các yếu tố độc lực và độc tố của chúng vì vậy mỗi nhóm *E. coli* gây tiêu chảy và có khả năng gây bệnh bằng các cơ chế khác nhau.

1.2.5. Khả năng lan truyền vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL

Các ESBL được mã hóa chủ yếu bởi các gen nằm trên các plasmid, một số gen mã hóa sinh ESBL nằm trên transposon, integron hoặc nhiễm sắc thể. Do đó hầu hết sự lan truyền các gen kháng kháng sinh thường liên quan đến các yếu tố di truyền động này. Cơ chế đa dạng của sự truyền thông tin di truyền này góp phần phát tán các gen đề kháng một cách nhanh chóng.

1.2.6. Các phương pháp nghiên cứu *E. coli* sinh ESBL

*** Các phương pháp chẩn đoán *E. coli* sinh ESBL**

Các phương pháp vi sinh lâm sàng bao gồm: khoan giấy kết hợp đôi, xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), băng giấy E-test, sử dụng máy tự động (Vitek, BD Phoenix), thanh thử Micro scan panel .

Các phương pháp sinh học phân tử bao gồm: Oligotyping, phản ứng trùng hợp chuỗi (PCR), phương pháp đa hình chiều dài các đoạn cắt bởi enzyme giới hạn (RFLP), PCR single-strDNA conformational polymorphism, phản ứng chuỗi Ligase , giải trình tự gen.

*** Các phương pháp sinh học phân tử nghiên cứu *E. coli* sinh ESBL.**

Một số phương pháp hiện đại nghiên cứu nguồn gốc, khả năng lan truyền của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL bao gồm: Điện di xung trường (PFGE), phân tích đặc điểm plasmid, Southern Blot, tiếp hợp, giải trình tự nhiều locus (MLST) và giải trình tự gen.

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm lấy mẫu nghiên cứu

Xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình.

2.1.2. Thời gian nghiên cứu

- Mục tiêu 1: Năm 2016

- Mục tiêu 2: Từ năm 2016 đến 2018

2.1.3. Đối tượng nghiên cứu

- Mục tiêu 1: Mẫu phân của những người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình.

- Mục tiêu 2: Các chủng *E. coli* phân lập được từ người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Mục tiêu 1: Được thiết kế theo phương pháp nghiên cứu dịch tễ học mô tả dựa trên cuộc điều tra cắt ngang qua xét nghiệm mẫu phân của những người khỏe mạnh tại 1 cộng đồng thuộc nông thôn ở huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình nhằm xác định sự lưu hành của *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh tại cộng đồng huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình.

Mục tiêu 2: Được thực hiện theo phương pháp nghiên cứu dịch tễ học mô tả qua phân tích mẫu tại phòng xét nghiệm để phân tích và đưa ra một số đặc điểm vi sinh học của các chủng *E. coli* sinh ESBL đã phân lập được

2.2.2. Phương pháp chọn mẫu và tính cỡ mẫu

***Phương pháp chọn mẫu**

+ Phương pháp chọn địa điểm nghiên cứu:

Chọn ngẫu nhiên huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình. Tại huyện Vũ Thư lập danh sách các xã có một số đặc điểm cơ bản về kinh tế, văn hóa, xã hội, môi trường và sức khỏe đặc trưng của các xã thuộc vùng nông thôn Thái Bình. Bốc thăm ngẫu nhiên chọn được xã Nguyên Xá để thực hiện nghiên cứu.

Tại xã Nguyên Xá, bốc thăm ngẫu nhiên chọn thôn Kiến Xá và 60 hộ gia đình trong thôn Kiến Xá để tiến hành nghiên cứu

+ Phương pháp chọn mẫu: Chọn mẫu toàn bộ

Lấy mẫu phân của tất cả những người đang sống trong hộ gia đình đó trừ những người đang phải điều trị các bệnh cấp tính và/hoặc có tiền sử dùng kháng sinh trong vòng 3 tháng trước khi lấy mẫu.

* **Phương pháp tính cỡ mẫu xét nghiệm phân:** Cỡ mẫu xác định tỷ lệ nhiễm *E. coli* trong cộng đồng được áp dụng theo công thức:

$$n = Z^2_{1-\alpha/2} \frac{p(1-p)}{(p \cdot \varepsilon)^2} \times k$$

- n: Cỡ mẫu nghiên cứu.

- $\alpha/2$: Độ tin cậy có ý nghĩa thống kê, trong nghiên cứu này lấy ở ngưỡng $\alpha = 0,05$; $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$.

- p: Ước tính tỷ lệ người khoẻ mạnh nhiễm *E. coli* sinh ESBL qua một cuộc điều tra thử trước đó (p được chọn là 65%).

- ε : Hệ số sai số mong đợi của p, trong nghiên cứu này chúng tôi chọn $\varepsilon = 0,15$.

- k: Hệ số thiết kế khi chọn mẫu chùm, với $k = 2$.

Với các dữ liệu trên, cỡ mẫu được tính toán là 184 mẫu. Nhằm đảm bảo cỡ mẫu nghiên cứu chúng tôi lập danh sách đối tượng thêm 20% so với cỡ mẫu. Trên thực tế chúng tôi thu thập được 212 mẫu phân của 212 người thuộc 59 hộ gia đình.

2.3. Các biến số và chỉ số nghiên cứu

- Các biến số và chỉ số về sự lưu hành *E. coli* sinh ESBL trong cộng đồng.

- Các biến số và chỉ số về đặc điểm sinh học của các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập được.

2.4. Vật liệu nghiên cứu

Bao gồm các sinh phẩm, máy móc, trang thiết bị và các chương trình phần mềm tin sinh học sử dụng trong nghiên cứu.

2.5. Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu

STT	Kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu	Nơi thực hiện
1	Kỹ thuật lấy mẫu phân	Xã Nguyên Xá
2	Phân lập và định danh <i>E. coli</i> từ mẫu phân dựa vào tính chất sinh vật, hóa học	Trung tâm Dịch vụ KHKT Y Dược, Đại học Y Dược Thái Bình
3	Xác định các chủng <i>E. coli</i> mang kiểu hình ESBL bằng kỹ thuật khoanh giấy kết hợp	
4	Xác định đặc điểm kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật khoanh giấy khuếch tán	
5	Xác định các gen mã hóa sinh ESBL của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR đa mồi	
6	Xác định gen <i>mcr-1</i> kháng colistin của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật realtime PCR	
7	Xác định đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR đa mồi	
8	Xác định gen độc lực của <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR đa mồi	
9	Xác định các loại plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR đa mồi	
10	Phân tích mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật PFGE	
11	Xác định vị trí các gen mã hóa sinh ESBL bằng kỹ thuật Southern Blot	Viện Y tế công cộng phủ Osaka, Nhật Bản
12	Đánh giá khả năng lan truyền các gen mã hóa sinh ESBL của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng hình thức tiếp hợp.	Viện Vệ sinh Dịch tễ TƯ Trường Đại học Y Dược TB

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Áp dụng các thuật toán thường sử dụng trong nghiên cứu y sinh học

2.7. Biện pháp không chế sai số

Đã thực hiện các biện pháp để không chế các sai số trong nghiên cứu

2.8. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thẩm định và chấp thuận phê duyệt của hội đồng đạo đức Trường Đại học Y Dược Thái Bình

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng nông thôn tỉnh Thái Bình

3.1.1. Đặc điểm của đối tượng xét nghiệm

Đối tượng nghiên cứu gồm 212 người, trong đó có 101 nam và 111 nữ, có độ tuổi từ 1 đến 89 tuổi, trung bình là $40,14 \pm 23,08$ tuổi, sống trong 59 hộ gia đình có từ 2 đến 7 thành viên. Phần lớn các đối tượng có trình độ trung học cơ sở (50%) và trung học phổ thông (25%) với nghề nghiệp chính là làm ruộng (43,6%).

3.1.2. Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh

Bảng 3.6. Kết quả cấy mẫu phân người trên MacConkey có CTX 1µg/ml

Vi khuẩn mọc trên MacConkey có CTX	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>E. coli</i>	169	79,7
Không phải <i>E. coli</i>	28	13,2
Không có vi khuẩn mọc	15	7,1
Tổng	212	100,0

Kết quả xét nghiệm cho thấy 79,7 % người khỏe mạnh có mang vi khuẩn *E. coli* kháng CTX và 13,2 % có mang vi khuẩn đường ruột khác kháng CTX.

Bảng 3.7. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh

<i>E. coli</i> sinh ESBL	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Trong cộng đồng (n=212)	137	64,6
Trong các chủng <i>E. coli</i> kháng CTX (n=169)	137	81,1

Tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh

là 64,6%. Tỷ lệ sinh ESBL của *E. coli* kháng CTX là 81,1%.

E. coli sinh ESBL xuất hiện ở mọi lứa tuổi, trong hầu hết (55/59) hộ gia đình có người tham gia nghiên cứu. Không có sự khác biệt về tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL giữa các nhóm có giới tính, trình độ học vấn và nghề nghiệp khác nhau.

3.2. Đặc điểm vi sinh y học của các chủng *E. coli* sinh ESBL

3.2.1. Đặc điểm sinh vật, hóa học của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Hầu hết các chủng *E. coli* sinh ESBL mang đầy đủ tính chất sinh vật, hóa học điển hình của *E. coli* trên 3 môi trường TSI, LIM, và CLIG như: Lên men glucose (100%), không sinh H₂S (100%), sinh Indol (94,9%), không lên lên cellobiose (100%), thủy phân β -glucuronidase (78,8%).

3.2.2. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Bảng 3.15. Tỷ lệ kháng các loại kháng sinh của *E. coli* sinh ESBL

Loại KS	Nhạy cảm	Trung gian	Kháng
	Số lượng (%)		
AMP	0 (0,0)	0 (0,0)	137 (100,0)
CAZ	35 (25,5)	59 (43,1)	43 (31,4)
FOX	130 (94,9)	1 (0,7)	6 (4,4)
MEM	135 (98,5)	0 (0,0)	2 (1,5)
STR	20 (14,6)	24 (17,5)	93 (67,9)
KAN	87 (63,5)	21 (15,3)	29 (21,2)
GEN	91 (66,4)	2 (1,5)	44 (32,1)
CIP	82 (59,9)	4 (2,9)	51 (37,2))
NAL	57 (41,6)	2 (1,5)	78 (56,9)
TET	29 (21,2)	2 (1,5)	106 (77,4)
CHL	88 (64,2)	2 (1,5)	47 (34,3)
SXT	26 (19)	0 (0,0)	111(81,0)
FOF	134 (97,8)	1 (0,7)	2 (1,5)

Các chủng *E. coli* sinh ESBL kháng các kháng sinh thông dụng với tỷ lệ khá cao từ 21,2% đến 100%. Tuy nhiên các chủng này còn nhạy cảm với cefoxitin, fosfomycin và meropenem.

Tất cả các chủng *E. coli* sinh ESBL đã kháng lại từ 1 đến 12 trong số 13 kháng sinh được thử nghiệm, trong đó phổ biến nhất là kháng lại từ 3 đến 9 kháng sinh. Tỷ lệ không nhạy cảm với 3 nhóm kháng sinh trở lên (MDR) là 86,1%, trong đó phổ biến nhất là không nhạy cảm với 5 và 6 nhóm kháng sinh với tỷ lệ lần lượt là 26,3 và 22,6%.

3.2.3. Đặc điểm các gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng *E. coli* sinh ESBL

Tỷ lệ các chủng *E. coli* sinh ESBL mang các gen mã hóa sinh ESBL nhóm CTX-M là 94,1 %, trong đó *blaCTX-M-9* là 66,3%, *blaCTX-M-1* là 26,3% và *blaCTX-M-9/CTX-M-1* là 1,5%. Tỷ lệ mang gen mã hóa sinh ESBL nhóm TEM là 45,3%, không phát hiện chủng nào mang gen mã hóa nhóm SHV.

Trong 1 chủng vi khuẩn có thể mang 1 gen mã hóa sinh ESBL (55,5%), mang 2 gen (41,6 %) hoặc mang đồng thời 3 gen (0,7%).

Bảng 3.19. Tỷ lệ xuất hiện các kiểu gen mã hóa sinh ESBL của *E. coli* sinh ESBL

Kiểu gen mã hóa ESBL	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>blaCTX-M-1</i>	13	9,5
<i>blaCTX-M-1/CTX-M-9</i>	1	0,7
<i>blaCTX-M-1/CTX-M-9/TEM</i>	1	0,7
<i>blaCTX-M-1/TEM</i>	23	16,8
<i>blaCTX-M-9</i>	58	42,3
<i>blaCTX-M-9/TEM</i>	33	24,1
<i>blaTEM</i>	5	3,6
Không phát hiện được các gen ở trên	3	2,2
Tổng	137	100,0

Kiểu gen phổ biến nhất là *blaCTX-M-9* (42,3%), tiếp đến *blaCTX-M-9/TEM* (24,1%) và *blaCTX-M-1/TEM* (16,8%). Các kiểu gen khác chiếm tỷ lệ thấp.

Bảng 3.20. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang kiểu gen *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9*

Tên kháng sinh	<i>blaCTX-M-1</i> (n=36)		<i>blaCTX-M-9</i> (n=91)		p
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
AMP	36	100,0	91	100,0	> 0,05
CAZ	23	63,9	15	16,5	<0,05
FOX	1	2,8	5	5,5	> 0,05
MEM	0	0,0	2	2,2	> 0,05
STR	27	75,0	57	62,6	> 0,05
KAN	17	47,2	11	12,1	< 0,05
GEN	15	41,7	27	29,7	> 0,05
CIP	23	63,9	25	27,5	< 0,05
NAL	27	75,0	44	48,4	< 0,05
TET	30	83,3	67	73,6	> 0,05
CHL	20	55,6	24	26,4	< 0,05
SXT	30	83,3	71	78,0	> 0,05
FOF	1	2,8	1	1,1	> 0,05

Các chủng *E. coli* mang kiểu gen *blaCTX-M-1* có tỷ lệ kháng với 1 số loại kháng sinh như CAZ, KAN, NAL, CHL cao hơn so với các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M-9* ($p < 0,05$).

Các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M-1* có tỷ lệ kháng đa thuốc thấp nhất (69,2%), các kiểu gen khác đều có tỷ lệ kháng đa thuốc cao (trên 90%). Các chủng mang càng nhiều gen mã hóa ESBL thì tỉ lệ kháng đa thuốc càng cao.

Kết quả xác định gen *mcr-1* kháng colistin cho thấy có 11/137 (8,0%) chủng *E. coli* sinh ESBL mang gen *mcr-1*.

3.2.4. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli*

sinh ESBL

Các chủng *E. coli* sinh ESBL thuộc nhóm A chiếm tỉ lệ cao nhất (43,1%), tiếp theo là nhóm D (32,1%), nhóm B1 (14,6%) và nhóm B2 chiếm tỉ lệ thấp nhất (10,2%). Có sự khác biệt mức độ kháng với các kháng sinh như: streptomycin, gentamycin, ciprofloxacin và chloramphenicol giữa các nhóm phát sinh loài. Không có sự khác biệt về tỷ lệ đa kháng thuốc giữa các nhóm phát sinh loài.

3.2.5. Đặc điểm các gen độc lực trong các chủng *E. coli* sinh ESBL

Bảng 3.24. Phân bố gen độc lực ở các chủng *E. coli* sinh ESBL

<i>E. coli</i> gây tiêu chảy	Tên gen độc lực	Số lượng	Tỷ lệ (%)
EAEC	<i>AstA</i>	29	21,1
EPEC	<i>AstA, bfpA</i>	6	4,4
	<i>bfpA</i>	8	5,8
	<i>eaeA</i>	6	4,4
	<i>AstA, eaeA</i>	1	0,7
	Tổng	21	15,6
ETEC	<i>AstA, LT</i>	1	0,7
	<i>AstA, LT, StIa</i>	1	0,7
	<i>AstA, StIb</i>	1	0,7
	<i>LT, StIa</i>	1	0,7
	<i>StIb</i>	3	2,2
	Tổng	7	5,0
EAEC / EPEC	<i>aggR, bfp</i>	1	0,7
EAEC /DAEC	<i>AstA, daaD</i>	5	3,6
Tổng các chủng mang gen độc lực		63	46,0
	Không phát hiện	74	54,0
Tổng		137	100,0

Trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện 46% chủng *E. coli* sinh ESBL mang các gen độc lực. Trong đó cao nhất là các chủng thuộc nhóm EAEC (21,1%), tiếp đó nhóm EPEC (15,6%), nhóm ETEC (5%). Có 5 chủng (3,6%) mang đồng thời các gen độc lực của nhóm EAEC và nhóm DEAC, 1 chủng (0,7%)

mang đồng thời gen độc lực của nhóm EAEC và EPEC.

Bảng 3.25. Đặc điểm kháng đa thuốc của các chủng mang gen độc lực

<i>E. coli</i> gây tiêu chảy	Không đa kháng		Kháng đa thuốc	
EAEC	2	6,9	27	93,1
EPEC	1	4,8	20	95,2
EAEC/DAEC	0	0	5	100
ETEC	3	50,0	3	50,0
EAEC/EPEC	0	0	1	100
Không phải <i>E. coli</i> gây tiêu chảy	7	9,45	67	90,55

Các chủng mang đồng thời gen độc lực của 2 nhóm đều là các chủng kháng đa thuốc. Tỷ lệ kháng đa thuốc cao (>90%) ở các chủng EAEC, EPEC và các chủng không mang gen độc lực. Các chủng mang gen độc lực thuộc nhóm ETEC có tỷ lệ kháng đa thuốc thấp nhất (50,0%). Không có sự khác biệt về tỷ lệ mang gen độc lực giữa các nhóm phát sinh loài.

3.2.6. Mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL

Trong tổng số 137 chủng *E. coli* sinh ESBL, có 4 chủng không phân loại được bằng PFGE. Kết quả PFGE của 133 chủng cho thấy 54,9% chủng *E. coli* sinh ESBL không có mối liên quan chặt chẽ về kiểu gen (có mức tương đồng dưới 80%), 45,1% các chủng thuộc các nhóm có mối liên quan chặt chẽ về kiểu gen (có mức tương đồng từ 80% trở lên), trong đó có 32 chủng (24%) có mối liên quan rất chặt chẽ về kiểu gen với có mức tương đồng từ 95-100%, đặc biệt 20 trong 32 chủng này có sự tương đồng hoàn toàn về kiểu gen (tương đồng 100%).

3.2.7. Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Trong 137 chủng nghiên cứu, chúng tôi phát hiện có 127 chủng (chiếm 92,7%) mang plasmid với tổng số 283 plasmid. Trên một chủng vi khuẩn có thể mang từ 1- 6 plasmid, trong đó phổ biến nhất là các chủng mang 2 plasmid (42,3%).

Bảng 3.27. Tỷ lệ các loại plasmid trên các chủng *E. coli* sinh ESBL

Loại plasmid	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>B/O</i>	30	21,9
<i>FIC</i>	4	2,92
<i>A/C</i>	2	1,46
<i>P</i>	6	4,38
<i>T</i>	2	1,46
<i>FIIA</i>	2	1,46
<i>FIA</i>	34	24,82
<i>FIB</i>	78	56,93
<i>Y</i>	11	8,03
<i>K/B</i>	4	2,92
<i>II</i>	13	9,49
<i>Frep</i>	71	51,82
<i>X</i>	6	4,38
<i>HI1</i>	5	3,65
<i>N</i>	5	3,65
<i>HI2</i>	6	4,38
<i>L/M</i>	4	2,92
<i>W</i>	0	0

Trong 18 plasmid chúng tôi sử dụng ở nghiên cứu này để xác định đặc điểm plasmid ở các chủng *E. coli* sinh ESBL thì FIB là plasmid là phổ biến nhất (56,93%), tiếp đến là Frep (51,82%), FIA (24,82%), B/O (21,9%), II (9,49%). Các plasmid khác như: FIC, A/C, P, T, FIIA, Y, K/B, X, HI1, N, HI2, L/M được phát hiện với tỷ lệ thấp. Không phát hiện chủng nào mang plasmid W.

Kết quả Southern Blot với 37 chủng *E. coli* sinh ESBL được chọn ngẫu nhiên từ 137 chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập được cho thấy 67,6% số chủng có các plasmid mang các gen mã hóa ESBL. Tỷ lệ phát hiện các plasmid chứa gen *bla*CTX-M-1 là 36,4%, *bla*CTX-M-9

là 76% và *blaTEM* là 75%. Trong các chủng đồng thời mang 2 gen mã hóa ESBL, chúng tôi phát hiện có 2 chủng mang 2 gen mã hóa sinh ESBL trên cùng một plasmid, 5 chủng mang 2 gen mã hóa sinh ESBL khác nhau trên 2 plasmid khác nhau.

Kết quả truyền các plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL giữa 41 chủng *E. coli* sinh ESBL cho *E. coli* J53 bằng phản ứng tiếp hợp cho thấy 39% chủng *E. coli* sinh ESBL đã truyền plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL cho *E. coli* J53 (có khuẩn lạc màu đỏ mọc trên môi trường MacConkey có chứa cefotaxime và NaN3). Các khuẩn lạc này đã được khẳng định có mang gen mã hóa sinh ESBL bằng phản ứng PCR. Kết quả này cho thấy nhóm nghiên cứu đã truyền thành công plasmid mang các gen mã hóa sinh ESBL sang *E. coli* J53 trong mô hình phòng thí nghiệm. Trong đó tỷ lệ truyền thành công plasmid mang các gen *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-9* và *blaTEM* lần lượt là 20%, 45,2% và 25%

Bảng 3.32. Số lượng gen có thể truyền trên các chủng mang 2 gen mã hóa ESBL

Số gen	Số lượng	Tỷ lệ
Truyền cả 2 gen	5	25,0 %
Truyền 1 gen	2	10,0 %
Không truyền	13	65,0
Tổng	20	100

Trong 41 chủng được sử dụng làm thử nghiệm tiếp hợp có 20 chủng mang đồng thời 2 gen mã hóa ESBL. Kết quả thí nghiệm của chúng tôi cho thấy có 7 chủng này xảy ra hiện tượng tiếp hợp, trong đó có 5/20 (25,0 %) chủng có thể truyền được plasmid của cả 2 gen.

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng nông thôn tỉnh Thái Bình

Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL tại cộng đồng trong nghiên cứu này (64,6%) tương đương với một số nghiên cứu tại châu Á như Trung

Quốc (50,5%), Thái Lan (61,7%), thành phố Hồ Chí Minh (63,1%). Tình trạng sử dụng kháng sinh không hợp lý của người dân trong điều trị và trong chăn nuôi là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự xuất hiện và gia tăng các vi khuẩn kháng thuốc. Thêm nữa, thói quen sử dụng phân người và gia súc trong trồng trọt và chăn nuôi tại Thái Bình kết hợp với điều kiện nhiệt đới của nước ta, vi khuẩn sinh ESBL tồn tại trong phân rất dễ tồn tại và sinh sôi nảy nở trong môi trường, làm tăng nguy cơ nhiễm ESBL cho cộng đồng. Mặt khác tình trạng nhiễm *E. coli* sinh ESBL trong thực phẩm ở khu vực này khá cao (68,4%) có lẽ cũng là nguồn quan trọng làm cho tình trạng mang *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh ở khu vực này cao.

Tỷ lệ sinh ESBL ở các chủng *E. coli* kháng CTX chiếm tỷ lệ rất cao (81,1%). Tỷ lệ này tương đương với tỷ lệ sinh ESBL ở các chủng *E. coli* kháng cephalosporin trong một nghiên cứu ở 30 nước châu Âu. Từ các kết quả này cho thấy có lẽ cơ chế chính đề kháng với cephalosporin thế hệ 3 của các chủng *E. coli* là do sinh các men ESBL làm bất hoạt các kháng sinh nhóm này.

Tình trạng mang *E. coli* sinh ESBL xuất hiện ở 93,2% các hộ gia đình, trong đó có tới 35,6% hộ gia đình có tất cả các thành viên mang *E. coli* sinh ESBL. Kết quả này cho thấy có thể có sự lây lan vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL cho nhau giữa các thành viên trong cùng hộ gia đình. Điều này có thể giải thích do dùng chung nguồn thức ăn, nước uống, có chung các điều kiện môi trường trong sinh hoạt hàng ngày như nguồn nước dùng trong sinh hoạt, nhà vệ sinh. Đây là những điều kiện phù hợp với các con đường lây truyền của *E. coli* là thông qua thức ăn, nguồn nước bị ô nhiễm, tiếp xúc với người bị nhiễm.

4.2. Đặc điểm vi sinh y học của các chủng *E. coli* sinh ESBL

4.2.2. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* sinh ESBL

E. coli sinh ESBL đã kháng các kháng sinh thông dụng hiện nay với tỷ lệ khá cao (21,2-100%). Mặt khác các chủng này kháng cùng lúc nhiều loại kháng sinh, thường từ 3 đến 9 kháng sinh gây tình

trạng kháng đa thuốc rất cao (86,1%). Nguyên nhân của tình trạng này có lẽ là do sự lạm dụng kháng sinh ở Việt Nam diễn ra khá phổ biến. Mặc dù đã có qui định về kê đơn và bán thuốc theo đơn, người bệnh vẫn có thể mua thuốc kháng sinh và nhiều loại thuốc khác trực tiếp từ các nhà thuốc và các quầy thuốc bán lẻ. Tự điều trị là tình trạng khá phổ biến, mặc dù tự chẩn đoán thường rất thiếu chính xác. Hơn nữa do thiếu kiến thức về sử dụng kháng sinh hợp lý, nhiều người dân sử dụng kháng sinh mà không tuân thủ chặt chẽ hướng dẫn về thời gian và liều lượng dùng thuốc kháng sinh. Vì vậy cần có những biện pháp để quản lý việc sử dụng kháng sinh một cách hợp lý trong cả bệnh viện và cộng đồng để hạn chế tình trạng kháng kháng sinh, đặc biệt là kháng đa thuốc ngày càng gia tăng trong cộng đồng.

4.2.3. Đặc điểm các gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng *E. coli* sinh ESBL

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự phân bố các gen mã hóa sinh ESBL là nhóm *blaCTX-M* (94,1%) và *blaTEM* (45,3%) cũng tương tự một số nghiên cứu ở Việt Nam trong thời gian gần đây. Qua đó cho thấy được khuynh hướng phân bố các gen mã hóa sinh ESBL ở Việt Nam cũng tương tự trên thế giới, nhất là sự phân bố phổ biến và rộng khắp của *blaCTX-M* thay vì *blaTEM* và *blaSHV*, từ đó có thể khẳng định sự biến hóa linh hoạt và khó dự đoán cũng như khó kiểm soát của tình trạng kháng kháng sinh ở vi khuẩn.

E. coli sinh ESBL có thể mang một hoặc nhiều gen mã hóa sinh ESBL. Trong nghiên cứu này, 42,3% các chủng mang từ 2 gen mã hóa sinh ESBL trở lên. Sự xuất hiện của nhiều gen mã hóa sinh ESBL trong cùng một chủng vi khuẩn sẽ làm thay đổi kiểu hình kháng kháng sinh theo hướng phức tạp hơn, và làm gia tăng mức độ kháng đa thuốc. Hơn nữa, trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện có 8% các chủng mang gen *mcr-1* kháng colistin. Việc mang gen kháng colistin ở các chủng kháng đa thuốc sẽ dẫn đến nguy cơ không còn kháng sinh để điều trị cho các chủng kháng đa thuốc. Vì vậy cần

có những biện pháp để quản lý và hạn chế sự lan truyền các vi khuẩn mang các gen kháng kháng sinh, đặc biệt là các trường hợp mang nhiều gen kháng kháng sinh để hạn chế sự lan truyền các nguồn tàng trữ gen kháng kháng sinh nguy hiểm cho cộng đồng.

4.2.4. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Phần lớn các chủng *E. coli* sinh ESBL trong nghiên cứu này là các *E. coli* cộng sinh đường ruột thông thường hoặc có thể là *E. coli* cơ hội gây bệnh lý đường ruột, thuộc các nhóm A (43,1%), D (32,1%) và B1 (14,6). Tuy nhiên 10,2% thuộc nhóm B2, là nhóm có độc lực cao, có khả năng gây bệnh ở đường tiêu hóa, tiết niệu và nhiễm khuẩn huyết vì vậy sự lưu hành nhóm B2 trong đường ruột người khỏe mạnh sẽ tiềm tàng nguy cơ gây bệnh cho những người khỏe mạnh trong cộng đồng.

4.2.5. Đặc điểm các gen độc lực của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Kết quả xác định 11 gen độc lực đại diện cho 6 nhóm *E. coli* gây tiêu chảy cho thấy có 63 chủng (46%) mang gen độc lực, trong đó phổ biến nhất là các chủng thuộc nhóm EAEC (21,1%), EPEC (15,6%). Ngoài ra chúng tôi phát hiện 6 chủng thể hiện đồng thời thuộc cả 2 nhóm EAEC/DEAC (5 chủng) và EAEC/EPEC (1 chủng). Việc mang các gen độc lực với tỷ lệ cao, kết hợp với việc mang đồng thời các gen độc lực thuộc nhiều nhóm *E. coli* gây tiêu chảy sẽ làm tăng nguy cơ xuất hiện tiêu chảy ở những người khỏe mạnh tại cộng đồng. Mặt khác hầu hết các chủng mang các gen độc lực là các chủng đa kháng thuốc. Đây là một vấn đề đáng lo ngại bởi lẽ sự lưu hành các chủng vi khuẩn mang đồng thời các gen độc lực và gen kháng đa thuốc ở trong người khỏe mạnh trong cộng đồng sẽ tiềm tàng nguy cơ gây ra các vụ dịch tiêu chảy trong cộng đồng, đặc biệt là các vi khuẩn này cư trú trong đường ruột, khi được đào thải ra ngoài qua phân, với điều kiện thời tiết nước ta rất dễ lan truyền và bùng phát các dịch tiêu chảy kháng đa thuốc tại cộng đồng.

4.2.6. Mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL

Phân tích kết quả PFGE cho thấy, các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập được có sự đa dạng về kiểu gen. Tuy nhiên giữa các chủng trong cùng một nhóm kiểu gen thường có mối liên hệ gần: 21,1% chủng có mối liên quan gần về kiểu gen với mức tương đồng từ 80% đến dưới 95%, trong khi 24% có mối liên quan rất chặt chẽ về kiểu gen với có mức tương đồng từ 95-100%. Các chủng có ngưỡng tương đồng từ 95% trở lên được phân bố trong 15 nhóm kiểu gen, trong đó phần lớn là các nhóm có 2 chủng (14/15 nhóm), chỉ có 1 nhóm có 4 chủng. Phân tích 15 nhóm kiểu gen này cho thấy có 9 nhóm chứa các chủng được phân lập từ các thành viên trong cùng hộ gia đình và 6 nhóm chứa các chủng được phân lập từ những người thuộc các hộ gia đình khác nhau. Các chủng có mối liên quan rất chặt chẽ với nhau có thể có cùng nguồn gốc di truyền và xuất phát từ cùng một nguồn lây nhiễm (thực phẩm, nước uống) hoặc có thể là sự lây nhiễm từ cá thể này sang cá thể khác. Sự lây nhiễm các chủng *E. coli* sinh ESBL này không chỉ xảy ra giữa các thành viên trong cùng một hộ gia đình mà còn đang xảy ra trong quần thể người khỏe mạnh tại Thái Bình. Do đó cần có các biện pháp can thiệp hiệu quả nhằm ngăn chặn sự lan truyền của các chủng vi khuẩn này trong cộng đồng.

4.2.7. Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Plasmid là một trong những yếu tố di truyền động có vai trò quan trọng trong sự lan truyền các gen kháng kháng sinh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện 92,7% các chủng *E. coli* sinh ESBL mang plasmid với tổng số 283 plasmid (trung bình 2,23 plasmid trên 1 chủng, phân bố từ 1- 6 plasmid trên 1 chủng). Trong đó phổ biến là các chủng mang 2 plasmid (42,3%) và 3 plasmid (27,7%). Việc mang đồng thời các plasmid đồng nghĩa với các vi khuẩn này mang nhiều gen kháng kháng sinh khác nhau trong đó có gen mã hóa ESBL. Hơn nữa, do đặc tính của plasmid là có thể truyền theo chiều dọc giữa các thể hệ vi khuẩn trong cùng loài hoặc truyền ngang từ vi khuẩn này

sang vi khuẩn khác trong cùng loài hoặc khác loài, nên sự lưu hành các vi khuẩn này ở người khỏe mạnh trong cộng đồng sẽ là nguồn tàng trữ và lan truyền các vi khuẩn kháng đa thuốc trong cộng đồng.

Trong số 17/18 plasmid được phát hiện, các plasmid thuộc nhóm IncF là phổ biến nhất (FIB: 56,93%; Frep:51,82%; FIA: 24,82%, FIC: 2,92%); tiếp đến là các plasmid nhóm I (B/O: 21,9% ; K/B: 2,92%, I1: 9,49%); các plasmid P, T, Y, K/B, X, HI1, N, HI2, L/M xuất hiện với tỷ lệ thấp. Không phát hiện chủng nào mang plasmid W. Sự phân bố rộng rãi của các plasmid thuộc nhóm IncF tương tự như kết quả nghiên cứu của Marcade và Johnson và dường như phù hợp với đặc điểm của các IncF là plasmid phổ biến nhất chứa các gen mã hóa ESBL.

Các nghiên cứu dịch tễ học phân tử các vi khuẩn sinh ESBL cho thấy hầu hết các gen mã hóa sinh ESBL ở các vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* nằm trên các plasmid có kích thước lớn (50kb đến >500kb). Tuy nhiên có một số chủng mang gen mã hóa sinh ESBL nằm trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng kỹ thuật Southern Blot nhằm xác định vị trí của các gen mã hóa sinh ESBL trên plasmid. Trong 37 chủng *E. coli* sinh ESBL được thực hiện kỹ thuật Southern Blot có 4 chủng mang gen *blaCTX-M-1*, 7 chủng mang *blaCTX-M-1/TEM*, 21 chủng mang *blaCTX-M-9*, 4 chủng mang *blaCTX-M-9/TEM* và 1 chủng mang *blaTEM*. Kết quả lai cho thấy, 25/37 chủng (chiếm 67,6%) mang gen mã hóa sinh ESBL nằm trên plasmid có kích thước từ 56,7 kb đến 157 kb. Kết quả này cho thấy phần lớn các gen mã hóa sinh ESBL nằm trên plasmid. Đây là điều kiện thuận lợi cho sự lan truyền các vi khuẩn mang các gen mã hóa sinh ESBL trong cộng đồng bởi lẽ nhiều nghiên cứu đã chứng minh plasmid là con đường chủ yếu lan truyền các gen kháng kháng sinh. Thông qua plasmid, các gen này có thể được truyền dọc từ thế hệ vi khuẩn này sang thế hệ vi khuẩn khác trong cùng loài. Nguy hiểm hơn các gen kháng thuốc này có thể được

truyền ngang từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác, thậm chí là từ vi khuẩn không gây bệnh sang vi khuẩn gây bệnh, làm gia tăng tình trạng kháng thuốc trong cộng đồng.

Các plasmid này có thể chứa một gen *blaCTX-M*, một gen *blaTEM* hoặc chứa đồng thời cả 2 gen *blaCTX-M/TEM*. Tỷ lệ phát hiện các plasmid mang gen *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-9* và *blaTEM* lần lượt là 36,4%, 76% và 75%. Điều này gợi ý khả năng lan truyền qua plasmid của các gen *blaCTX-M-9* và *blaTEM* có thể cao hơn so với các gen *blaCTX-M-1*.

Trong 11 chủng mang đồng thời 2 gen mã hóa sinh ESBL thì ở 6 chủng cả 2 gen này đều nằm trên plasmid. Việc mang cùng lúc các plasmid chứa đồng thời 2 gen, đặc biệt là việc mang đồng thời 2 gen trên cùng 1 plasmid ở cùng 1 chủng vi khuẩn sẽ tạo điều kiện thuận lợi làm gia tăng khả năng lan truyền các gen mã hóa sinh ESBL trong cộng đồng thông qua sự lan truyền các plasmid.

Một số kết quả nghiên cứu đã cho thấy sự tiếp hợp giữa các vi khuẩn đã làm lan truyền gen kháng kháng sinh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh 39,0 % các chủng vi khuẩn có khả năng truyền các plasmid mang các gen mã hóa sinh ESBL sang vi khuẩn *E. coli* J53 bằng cơ chế tiếp hợp. Tỷ lệ truyền plasmid này của chúng tôi cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Trần Huy Hoàng khi truyền plasmid của các vi khuẩn khác cho *E. coli* J53. Có lẽ là do vi khuẩn cho của chúng tôi là *E. coli* nên giữa các vi khuẩn *E. coli* có thể dễ dàng xảy ra hiện tượng truyền plasmid hơn. Kết quả này cho thấy các vi khuẩn trong cùng loài *E. coli* có thể dễ dàng truyền gen kháng kháng sinh cho nhau. Đây là một vấn đề rất đáng lo ngại vì các các plasmid mang gen mã hóa ESBL có khả năng truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác sẽ tạo điều kiện cho sự lây lan nhanh chóng các gen kháng kháng sinh trong quần thể vi khuẩn *E. coli* nói riêng và từ vi khuẩn *E. coli* sang các vi khuẩn gây bệnh khác.

Ở các chủng mang 2 gen mã hóa sinh ESBL thì tỷ lệ truyền đồng

thời cả 2 gen (25%) cao hơn so với chỉ truyền 1 gen (10%). Mặc dù số lượng các chủng mang 2 gen trong thử nghiệm của chúng tôi còn ít nên chưa thể đánh giá chính xác được tỷ lệ truyền gen của các chủng vi khuẩn mang từ 2 gen kháng kháng sinh trở lên, nhưng nó cũng cho thấy được xu hướng các vi khuẩn mang nhiều gen mà hóa ESBL có thể truyền đồng thời nhiều gen cùng lúc cho các chủng vi khuẩn khác. Kết quả này của chúng tôi cũng tương tự như nghiên cứu của Vaidya về khả năng truyền cùng lúc gen kháng kháng sinh của các vi khuẩn sinh ESBL thông qua hình thức tiếp hợp. Đây là một trong những nguyên nhân quan trọng làm cho tình trạng vi khuẩn kháng kháng sinh ngày càng lan rộng trong cộng đồng, đặc biệt là sự lan rộng của các chủng vi khuẩn kháng đa thuốc do truyền đồng thời cùng lúc nhiều gen kháng thuốc.

Việc chứng minh được các chủng *E. coli* sinh ESBL thu thập tại cộng đồng tại Thái Bình có khả năng truyền plasmid chứa gen mà hóa ESBL sang *E. coli* J53 trong mô hình phòng thí nghiệm cho thấy khả năng và mức độ nguy hiểm về sự lây lan của các gen mã hóa sinh ESBL tại Việt Nam không chỉ xảy ra tại bệnh viện mà còn có thể dễ dàng xảy ra tại cộng đồng. Đây là một thực trạng gây nhiều khó khăn trong công tác kiểm soát, phòng chống nguy cơ lan truyền các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL nói riêng và các vi khuẩn kháng kháng sinh nói chung. Kết quả nghiên cứu này giúp chúng ta hiểu sâu hơn về đặc tính lan truyền của vi khuẩn mang gen mã hóa sinh ESBL tại Việt Nam.

KẾT LUẬN

1. Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng nông thôn tỉnh Thái Bình.

Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình chiếm tỷ lệ cao: 64,6% (137/212). Tỷ lệ sinh ESBL của các chủng *E. coli* kháng CTX được phân lập từ những người khỏe mạnh chiếm tỷ lệ rất cao

137/169 (81,1%).

Không có sự khác biệt về tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL giữa những người có giới tính, nhóm tuổi, trình độ học vấn và nghề nghiệp khác nhau.

2. Đặc điểm vi sinh y học của các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập được tại địa bàn nghiên cứu

- **Đặc điểm kháng kháng sinh:** Các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL kháng hoàn toàn với ampicillin, kháng khá cao (21,2% đến 81%) với các kháng sinh thông dụng. *E. coli* sinh ESBL kháng đa thuốc chiếm tỷ lệ cao (86,1%).

- **Đặc điểm gen mã hóa sinh ESBL:** 91,4 % các chủng mang gen mã hóa sinh CTX-M, trong đó phổ biến nhất là *blaCTX-M-9* (66,3%). Tỷ lệ mang *blaTEM* là 45,3%, không phát hiện chủng nào mang *blaSHV*. Trên 1 chủng *E. coli* sinh ESBL có thể mang từ 1-3 gen mã hóa ESBL, trong đó phổ biến nhất là mang 1 gen (55,5%) và 2 gen (41,6%) với kiểu kết hợp *blaCTX-M/TEM* chiếm đa số.

- **Đặc điểm gen kháng colistin:** Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL mang gen *mcr-1* kháng colistin là 8%

- **Đặc điểm nhóm phát sinh loài:** 89,8 % các chủng *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh tại cộng đồng là vi khuẩn *E. coli* cộng sinh đường ruột thông thường thuộc các nhóm A (43,1%), D (32,1%) và B1(14,6%); 10,2 % thuộc nhóm B2, là nhóm có độc lực cao, có khả năng gây bệnh.

- **Đặc điểm các gen độc lực:** 46% các chủng *E. coli* sinh ESBL mang gen độc lực. Trong đó phổ biến nhất là các chủng *E. coli* thuộc nhóm EAEC (21,1%) và EPEC (15,6%).

- **Mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL:** Các chủng *E. coli* sinh ESBL khá đa dạng về kiểu gen. Tuy nhiên kết quả PFGE cho thấy có sự lây nhiễm của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL giữa các giữa các thành viên trong cùng hộ gia đình (với 9 nhóm kiểu gen bao gồm 20 chủng có sự tương đồng gen 95-110% giữa các thành

viên trong cùng nhóm) và trong cộng đồng người khỏe mạnh tại nông thôn Thái Bình (với 6 nhóm kiểu gen bao gồm 12 chủng có sự tương đồng gen 95-110% giữa các thành viên trong cùng nhóm).

- Đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL:

+ 92,7% các chủng *E. coli* sinh ESBL mang các plasmid chứa gen mã hóa sinh ESBL với số plasmid trung bình là 2,23 plasmid /chủng. Các plasmid thuộc nhóm IncF là phổ biến nhất (FIB: 56,93%; Frep:51,82%; FIA: 24,82%, FIC: 2,92%); tiếp đến là các plasmid nhóm I (B/O: 21,9%; K/B: 2,92%, I1: 9,49%), ngoài ra còn có các plasmid P, T, Y, K/B, X, HI1, N, HI2, L/M với tỷ lệ thấp.

+ Các plasmid có thể chứa một gen *blaCTX-M*, một gen *blaTEM* hoặc chứa đồng thời cả 2 gen *blaCTX-M/TEM*. Tỷ lệ phát hiện các plasmid mang gen *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-9* và *blaTEM* bằng Southern Blot lần lượt là 36,4%, 76% và 75%.

+Từ mô hình phòng thí nghiệm đã xác định các chủng *E. coli* sinh ESBL được thu thập tại cộng đồng ở Thái Bình có khả năng truyền plasmid chứa gen mã hóa ESBL sang *E. coli* J53.

